

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Juliana Bittencourt Garcia

DESENVOLVIMENTO DO AERÊNQUIMA EM RAÍZES DE  
*CERATOPTERIS RICHARDII* BRONGN. (PTERIDACEAE) SUBMETIDAS A  
ESTRESSE HÍDRICO

Porto Alegre – RS

2016

Juliana Bittencourt Garcia

DESENVOLVIMENTO DO AERÊNQUIMA EM RAÍZES DE  
*CERATOPTERIS RICHARDII* BRONGN. (PTERIDACEAE) SUBMETIDAS A  
ESTRESSE HÍDRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra Antunes Mastroberti

Porto Alegre

2016

*"Nothing in Biology makes sense except in the light of evolution".*

(Theodosius Dobzhansky)

*Dedico este trabalho à minha família.*

## AGRADECIMENTOS

À professora Simone Yamasaki David, grande responsável por minha escolha.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra Antunes Mastroberti, pelas discussões e ensinamentos, essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleusa Bona, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Rebello Dillenburg e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cecília de Chiara Moço, pela solicitude em participar da avaliação.

Aos professores e alunos do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFRGS, pela boa convivência, disponibilidade e discussões que sempre acrescentaram em minha formação.

Ao professor Dr. Claudimar Fior, pela contribuição na metodologia deste trabalho.

Ao colega Gustavo Klamer de Almeida, pela contribuição da análise estatística.

À técnica Juliana Troleis, pela amizade, prontidão e disposição em auxiliar, facilitando toda dinâmica do laboratório.

Aos amigos Bruna Baratto, Fernanda Nogueira, Lukiel Oliveira, Marcos Gaeta e Sofia Kuhn, por estarem sempre prontos a me ajudar e por todos os ótimos momentos, dentro e fora do laboratório.

À minha família, por todo apoio e incentivo durante estes anos de estudos.

À Bianca Mastrantonio, pela ilustração botânica, por seu apoio e incondicional companheirismo.

À Capes, pela bolsa concedida durante os dois anos de mestrado.

À todos aqueles que direta ou indiretamente participaram de minha formação.

Muito obrigada!

## APRESENTAÇÃO

Este trabalho está organizado na forma de dissertação, e está formatado de acordo com o periódico *Acta Botanica Brasilica*.

## RESUMO

O aerênquima é um tecido vegetal com grandes lacunas de ar que podem ter função de circulação de gases e/ou sustentação de órgãos, estando presente nas raízes e órgãos aéreos de plantas aquáticas ou sob alagamento, podendo ainda ser formado em decorrência de algum estresse. *Ceratopteris richardii* é uma planta aquática, de hábito anfíbio que apresenta aerênquima em seus órgãos vegetativos. Dessa forma, esse trabalho buscou analisar a formação de aerênquima nas raízes e pecíolo desta espécie frente a uma situação de restrição hídrica e verificar sua plasticidade fenotípica. Vinte indivíduos de *C. richardii* foram cultivados e submetidos a um tratamento com diferentes concentrações de PEG 6000. Em todas as amostras analisadas, foi observada a formação de aerênquima. A análise qualitativa mostrou diferença entre os tratamentos, porém, a análise estatística revelou que as diferenças não são significativas para o número amostral empregado. Variações de crescimento do esporófito revelaram que a espécie de estudo modificou algumas características de desenvolvimento em resposta a restrição hídrica. Tais resultados revelam importantes características para esta espécie, que parece aclimatar-se a situação de estresse a qual foi submetida. Com base nisso, sugere-se ampliar estes estudos para elucidar questões relacionadas a formação de aerênquima e o ambiente, seja para esta espécie ou de outro grupo taxonômico.

**Palavras-chave:** aerênquima, *Ceratopteris richardii*, plantas aquáticas, plasticidade fenotípica, restrição hídrica, samambaias.

## ABSTRACT

Aerenchyma is a plant tissue with large air gaps that may have gas circulation function and / or sustain organs. This structure is present in roots and aerial organs of water plants and in plants under flooding it may also be formed during some stress. *Ceratopteris richardii* is an aquatic plant, with amphibious habit that has aerenchyma in their vegetative organs. Thus, the aim of this study is analyze the aerenchyma formation in roots and stem of this specie under water restriction situation and verify their phenotypic plasticity. Twenty specimen of *C. richardii* were cultured and subjected to treatment with different concentrations of PEG 6000. In all samples, were observed aerenchyma formation. Qualitative analysis showed differences among treatments, however, the statistical analysis revealed that the differences are not significant for the sample size. Sporophyte growth variations revealed that the specie of study modified some growth characteristics in response to water restriction. These results reveal important characteristics for *C. richardii*, which seems to acclimatize the stress situation which has submitted. On the base that, it is suggested further studies to become clearer the relation between aerenchyma formation and environment, even to either this species or another taxonomic group.

**Key words: aerenchyma, aquatic plants, *Ceratopteris richardii*, ferns, phenotypic plasticity, water restriction.**

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1 Sobre o Aerênquima.....	1
1.2 Estresse hídrico em plantas .....	3
1.3 Desenvolvimento e Plasticidade Fenotípica da Raiz.....	4
1.4 Família Pteridaceae e o Gênero <i>Ceratopteris</i> .....	7
1.5 <i>Ceratopteris richardii</i> Brongn. ....	8
<b>2. Objetivos</b> .....	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
<b>3. Material e Métodos</b> .....	12
3.1. Material Botânico .....	12
3.2. Microscopia fotônica.....	13
3.3 Análise estatística.....	15
<b>4. Resultados</b> .....	16
4.1 O esporófito.....	16
4.2 Breve descrição do desenvolvimento da raiz e aerênquima.....	16
4.3 Formação do aerênquima durante a limitação hídrica .....	17
<b>5. Discussão</b> .....	19
Referências bibliográficas .....	23
ANEXO 1 – TABELAS .....	30
ANEXO 2 – FIGURAS.....	33

## 1. Introdução

### 1.1 Sobre o Aerênquima

Plantas aquáticas ou sob inundação temporária apresentam algumas características morfo-anatômicas particulares em seus tecidos e órgãos (Drew *et al.* 1979). A formação de um tecido parenquimatoso especializado denominado aerênquima é parte do desenvolvimento dessas plantas, ou ainda, uma resposta a algum tipo de estresse, como por exemplo, a hipóxia resultante de um alagamento (Haberlandt 1896; Evans 2004). Através de trabalhos como os de Kawase (1972; 1974), Drew *et al.* (1989) e He *et al.* (1996), sabe-se que enzimas que atuam no metabolismo da parede celular, resultando na formação de aerênquima são induzidas por etileno, o qual, por sua vez, tem sua produção estimulada pela hipóxia.

O aerênquima é um tecido vegetal parenquimatoso caracterizado por apresentar grandes lacunas de ar que podem ter função de circulação e armazenamento de gases e/ou sustentação de órgãos. Esse tecido pode ser encontrado em plantas de diversos grupos taxonômicos, devido à evolução convergente dos mesmos para sobreviverem em ambiente aquático, onde a disponibilidade de oxigênio (O<sub>2</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é menor (Rascio 2002).

Schenck (1890) foi o primeiro a utilizar o termo “aerênquima”, porém De Bary (1877) já havia descrito dois processos básicos de formação de lacunas de ar ou preenchidas com exudatos: processo esquizógeno, que se caracteriza pela formação de grandes lacunas originadas nos vértices celulares próximos às zonas de junção; e o processo lisígeno, que envolve um grupo de células que coalescem, degenerando as paredes celulares, o que resulta na formação de uma câmara. Evans (2004), Seago *et al.* (2005) e Jung *et al.* (2008) reconsideraram esses padrões descritos. Deste modo, o aerênquima esquizógeno é resultado da separação celular, sem que haja morte; enquanto o aerênquima lisígeno é resultado da morte celular programada (Evans 2004).

Seago *et al.* (2005) descreveram um outro processo de formação de aerênquima, o expansígeno, o qual caracteriza-se pela formação de lacunas ou câmaras de ar pela divisão seguida de expansão celular, sem que ocorra separação, colapso ou morte das células. Os autores classificaram o aerênquima em cinco tipos: expansígeno, esquizógeno e lisígeno (já descritos acima); aerênquima misto, onde lacunas esquizógenas ocorrem juntamente com algumas poucas expansões; esquizo-lisígeno, no qual ocorre a separação de células ao longo do eixo radial, seguida de morte de algumas células. Os autores também subdividiram o processo lisígeno em três tipos: radial, tangencial e em pacotes, relatando que esses processos são iniciados por separações esquizógenas e seguidos por colapso e/ou morte celular. No lisígeno radial, separações esquizógenas, seguidas de colapso ou morte, ocorrem ao longo de setores radiais no córtex médio. Já no processo lisígeno tangencial, separações e colapsos celulares ocorrem em setores tangenciais, entre fileiras radiais de células intactas. No aerênquima lisígeno em pacotes, células de fileiras radiais dividem-se anticlinalmente e de maneira desigual para a formação de uma nova fileira, e, posteriormente, todas ou a maioria destas células recém formadas, colapsam ou morrem para formar as lacunas.

Foram apresentadas por Jung *et al.* (2008), variações dos tipos esquizógeno e lisígeno. Para isso, os autores basearam-se na morfologia do aerênquima de acordo com o arranjo das células. Os mesmos ainda identificaram os tipos lisígeno radial e expansígeno, que haviam sido anteriormente propostos por Seago *et al.* (2005), como lisígeno em pacotes e esquizógeno favo de mel, respectivamente. Segundo os autores supracitados a grande diversidade estrutural encontrada no aerênquima pode ser o reflexo de processos fisiológicos e/ou adaptativos ao ambiente e, apesar de sua formação, seja no processo esquizógeno ou lisígeno, usualmente ser relacionado à hipóxia, outras fontes de estresse, como alta temperatura, seca (limitação hídrica) e deficiência nutricional também parecem promover a formação do aerênquima (Gunawardena *et al.* 2001; Evans 2004).

## 1.2 Estresse hídrico em plantas

Durante seu ciclo de vida, nem sempre as plantas encontram condições ambientais em que os fatores sejam favoráveis ao seu desenvolvimento. A redução na disponibilidade de água no solo, por exemplo, é um importante fator ambiental que limita o crescimento dos vegetais. Na natureza, o estresse hídrico ocorre, geralmente, de maneira gradual e as plantas que desenvolvem mecanismos para adaptarem-se as condições de baixa disponibilidade hídrica, tornam-se tolerantes (Chaves Filho & Stacciarini-Seraphin 2001). Alterações no comportamento vegetal causadas pela deficiência hídrica podem ser irreversíveis. Esta irreversibilidade vai depender do genótipo (capacidade de resposta à mudança), do tempo de exposição ao estresse, da severidade e da fase de desenvolvimento da planta (Santos & Carlesso 1998).

A habilidade de um organismo alterar sua fisiologia e/ou morfologia em decorrência de sua interação com o ambiente é chamada de plasticidade fenotípica (Bradshaw 1965; Scheiner 1993). A mesma pode ser considerada um mecanismo gerador de variabilidade fenotípica, criando oportunidades para a conquista de novos ambientes (Cardoso & Lomônaco 2003). Segundo Wells & Pigliucci (2000), alterações fenotípicas relacionadas à limitação de algum recurso representam uma resposta frente às condições adversas, podendo indicar uma vantagem para o organismo.

Os diferentes órgãos das plantas podem responder de maneira distinta frente às alterações ambientais a que são expostos. De acordo com Ludlow & Muchow (1990), uma variação significativa no desenvolvimento radicular é causada quando há uma redução no conteúdo de água no solo; isto pode levar a uma mudança no período de disponibilidade e na quantidade de água disponível para as plantas. Inúmeros trabalhos tratam a formação de aerênquima em raízes como resposta ao alagamento (Justin & Armstrong 1987; Burdick 1989; He *et al.* 1994; Leite *et al.* 2012), porém, poucos estudos mencionam a restrição hídrica

e/ou nutricional como também responsáveis pela formação deste tecido, tais como Drew *et al.* (1989), que relacionam a deficiência de nitrogênio ou fosfato com a formação de aerênquima; He *et al.* (1994), que apresentam um estudo sobre o efeito da deficiência de nitrogênio; e Dantas *et al.* (2001), os quais relacionam a presença de cálcio com retardo na lise celular e, conseqüentemente redução do tecido (os três trabalhos utilizaram raízes de milho para os estudos).

Além das raízes, os órgãos aéreos dos vegetais também são afetados pela baixa disponibilidade hídrica. A redução da área foliar, por exemplo, é tratada por autores como McCree & Fernández (1989) e Taiz & Zeiger (2013) como a resposta mais proeminente ao déficit hídrico, uma vez que a expansão foliar é um processo administrado pela turgidez celular. Outro órgão que pode apresentar respostas quanto à deficiência hídrica é o pecíolo. Em um trabalho de Marschner (1986) é visto que, em decorrência da limitação hídrica, a absorção de cálcio pode ser afetada, causando a desintegração da parede celular e, assim, o colapso dos tecidos acometidos. Em um estudo com soja, Mascarenhas *et al.* (1992) observaram o colapso do pecíolo (dobramento seguido de necrose) em plantas que sofreram déficit hídrico e, conseqüentemente baixa absorção de cálcio; os autores associaram esse distúrbio com a estabilidade que o cálcio daria à parede celular.

### 1.3 Desenvolvimento e Plasticidade Fenotípica da Raiz

A raiz é um órgão presente nos esporófitos das plantas vasculares, embora elas não ocorram em algumas plantas vasculares ancestrais tais como em *Psilotum* spp., em *Wolffia* spp. e em plantas epifíticas como em *Tillandsia* spp. As raízes, além das funções primárias de ancorar e sustentar a planta ao substrato, são responsáveis pela absorção e transporte de água, minerais e armazenamento de fotoassimilados. Plantas avasculares, como musgos e hepáticas,

desenvolvem rizóides filiformes (estruturas semelhantes a raízes); estas estruturas também podem ser encontradas em gametófitos de plantas vasculares sem sementes, como as samambaias (Bellini *et al.* 2014).

A influência das raízes em seu ambiente circundante permitiu mudanças fundamentais no ambiente da Terra, incluindo decréscimo na concentração do dióxido de carbono atmosférico (CO<sub>2</sub>), decréscimo na temperatura global e a formação de ambientes de solo mais complexos (Kenrick & Crane 1997; Raven & Edwards 2001; Pires & Dolan 2012). As interações entre as raízes das plantas e seu ambiente circundante, dessa forma, continuam a influenciar os ciclos de carbono e nitrogênio do planeta.

Numa abordagem estrutural, plantas sem sementes, como as samambaias, possuem uma organização meristemática diferenciada, o que oportuniza estudos sobre desenvolvimento de raiz em um contexto anatômico mais simples do que em angiospermas (Hou & Hill 2004). Os tecidos das raízes das angiospermas podem ser originados a partir de dois tipos diferentes de organização: aberto – onde um grupo de células iniciais origina os três meristemas primários (protoderme, meristema fundamental e procâmbio), além da coifa; ou fechado – onde existem três a quatro grupos de iniciais, onde cada grupo de iniciais é responsável pela formação de determinados meristemas primários. Em contrapartida, os tecidos das raízes das samambaias originam-se de uma única célula apical inicial tetraédrica (Bierhorst 1971; Gifford 1983; Gifford & Foster 1989; Imaichi 2008) para a maioria das samambaias leptosporangiadas (Gunning *et al.* 1978; Gunning 1982), ou lenticular em *Pteridium aquilinum*, configurando uma exceção (Ogura 1972).

Além disso, acredita-se que a plasticidade fenotípica das raízes é resultado adaptativo frente aos diferentes habitats (Jung *et al.* 2008). Embora seja muito difundido que as raízes possam ter respostas adaptativas a vários tipos de estresse como alagamento ou seca, os

processos de desenvolvimento no âmbito estrutural e molecular ainda não são completamente conhecidos (Bellini *et al.* 2014).

A maioria das raízes de plantas que desenvolvem aerênquima, seja em angiospermas ou não, possuem aerênquima lisígeno (Jung *et al.* 2008); entretanto, segundo os mesmos autores, *Isoetes*, que é um gênero de licófitas eusporangiadas, e *Marsilea*, que é um gênero de monilófitas leptosporangiadas (Judd *et al.* 2009), possuem raízes com formação de aerênquima do tipo esquizógeno oco e lisígeno radial, respectivamente. As razões que levaram algumas plantas a formação do aerênquima em diferentes processos de desenvolvimento como esquizógeno e/ou lisígeno permanecem desconhecidas (e.g. Evans 2004; Jung *et al.* 2008). O que se constata na literatura é que estudos das formas adaptativas de plantas aquáticas, em pteridófitas, ainda são uma lacuna no conhecimento.

Visto a importância ecológica e a variabilidade morfológica/estrutural que as plantas podem apresentar em diferentes sistemas de raízes, a formação do aerênquima torna-se um importante diagnóstico das respostas adaptativas à diversidade ambiental em diferentes grupos taxonômicos (Seago *et al.* 2005; Jung *et al.* 2008). Além disso, o aerênquima em raízes, por viabilizar o transporte de gases da atmosfera como o oxigênio (O<sub>2</sub>) e nitrogênio (N<sub>2</sub>), por exemplo, corrobora com mais uma evidência da importância eco-fisiológica deste tecido (Jackson & Armstrong 1999).

Abordagens estruturais e moleculares têm mostrado que alguns padrões de desenvolvimento, como a formação de raiz lateral, por exemplo, se diferenciam entre plantas com uma única célula apical inicial na raiz, tais como as monilófitas e *Selaginella*, daquelas com grupos de iniciais (Seago & Fernando 2013). Se isto se reflete no processo de desenvolvimento da raiz como um todo, inclusive formação do aerênquima, ainda permanece desconhecido. Por isso, estudos em monilófitas parecem ser interessantes para fins comparativos com outras plantas vasculares e para ampliar o conhecimento em organogênese.

#### 1.4 Família Pteridaceae e o Gênero *Ceratopteris*

A família Pteridaceae, segundo Smith *et al.* (2006), é composta por mais de 1000 espécies, distribuídas em mais 50 gêneros, representando cerca de 10% da diversidade de samambaias leptosporangiadas existentes. Uma família claramente monofilética, em análises filogenéticas anteriores (Gastony & Johnson 2001; Hasebe *et al.* 1995; Pryer *et al.* 1995; Schneider *et al.* 2004), tem como característica o dimorfismo foliar - possuindo folhas férteis e estéreis (Fig. 1), esporângios localizados ao longo das margens de suas frondes (folhas), frequentemente protegidos por segmentos recurvados da própria margem (pseudoindúcio) (Kramer 1990; Tryon *et al.* 1990).

Pteridaceae tem uma distribuição cosmopolita concentrada em regiões tropicais úmidas, ocupando uma ampla variedade de nichos ecológicos. Diferencia-se de outras famílias de samambaias por englobar espécies terrestres, epífitas, rupestres e ainda espécies aquáticas (Tryon & Tryon 1982).

A família Pteridaceae constitui um grupo muito interessante de plantas, principalmente pela grande heterogeneidade de seus gêneros e espécies, aliada ao fato de ser uma família com grande representatividade e importância, em nível florístico, na região neotropical (Prado 1993). De acordo com Schuettpelz *et al.* (2007), Pteridaceae abriga atualmente cinco subfamílias: Cryptogrammoideae, Ceratopteridoideae, Pteridoideae, Adiantoideae e Cheilantheroideae. A filogenia da família Pteridaceae pode ser observada na figura 2.

*Acrostichum* e *Ceratopteris* estão circunscritos na subfamília Ceratopteridoideae e são os únicos membros aquáticos de toda a família Pteridaceae. Ambos os gêneros possuem adaptações morfológicas devidas ao hábito, incluindo a formação de aerênquima (Schneider 1996; Schuettpelz *et al.* 2007). De acordo com Schuettpelz *et al.* (2007), este clado é bem suportado por alocar a espécie *Ceratopteris richardii*, um modelo para investigação genética e

de desenvolvimento em plantas vasculares sem sementes (Banks *et al.* 1993; Hickok *et al.* 1995; Chatterjee & Roux 2000; Leroux *et al.* 2013).

*Ceratopteris* é um gênero de samambaias homosporadas, aquáticas, de hábito anfíbio, com distribuição pan-tropical. Durante muito tempo, a delimitação das espécies do gênero foi muito confusa, devido principalmente aos diferentes tamanhos, formas e tipos de recortes de suas frondes estéreis (Lloyd 1974).

Lloyd (1974) considerou que *Ceratopteris* possui uma infinidade de formas, caracterizando polimorfismo fenotípico para o gênero. Devido a esta variedade morfológica, 12 espécies haviam sido descritas para *Ceratopteris*, embora outros pesquisadores (Campbell 1905; Bower 1923 *apud* Lloyd 1974) considerassem uma única espécie, *Ceratopteris thalictroides*, com diferentes morfotipos.

Atualmente, de acordo com a análise filogenética de Schuettpelz *et al.* (2007), o gênero *Ceratopteris* aloca 3 espécies: *Ceratopteris pteridoides*, *Ceratopteris thalictroides* e *Ceratopteris richardii*, a espécie em estudo neste trabalho. Todas as espécies possuem características morfológicas que foram interpretadas como adaptações a um hábito de vida aquático, como por exemplo, a formação de aerênquima (Schneider 1996). A distribuição atual do gênero é ilustrada pela figura 3.

### 1.5 *Ceratopteris richardii* Brongn.

*Ceratopteris richardii* Brongn. (Pteridaceae) é uma samambaia homosporada, ou seja, produz um tipo de esporo que dará origem a um gametófito hermafrodita ou masculino; leptosporangiada, onde esporângio é originado a partir de uma única célula inicial. É uma planta aquática de hábito anfíbio, com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Lloyd 1974; Masuyama 1992). Devido a este hábito, os exemplares da espécie podem

completar o seu ciclo de vida tanto em hábitat aquático, como em hábitat subaquático ou de solo alagado. De fácil cultivo, adapta-se com sucesso sob condições controladas de desenvolvimento.

Sua morfologia pode ser caracterizada por seu dimorfismo foliar. No início de seu desenvolvimento, os esporófitos apresentam frondes estéreis e trilobadas ovaladas, porém, novas frondes tornam-se progressivamente maiores e mais recortadas; as frondes férteis são sempre pinatisssectas (Lloyd 1974). Por tratar-se de uma planta aquática de hábito anfíbio, apresenta a formação de aerênquima tanto nas raízes como nas partes aéreas (Leroux *et al.* 2013).

*C. richardii* surgiu como um modelo útil para investigação de genes envolvidos na sinalização para definição sexual de gametófitos, dentro de um sistema de plantas sem sementes (Banks *et al.* 1993; Hickok *et al.* 1995; Chatterjee & Roux 2000). Esta espécie é descrita para utilização como planta modelo por diversos autores (e.g. Hickok *et al.* 1995; Banks 1999; Hoffman & Vaughn 1995), devido principalmente a: facilidade de crescimento em cultura, ciclo de vida curto (pode ser concluído em menos de 120 dias), produção contínua e abundante de esporos, viabilidade dos esporos e gametófitos hermafroditas, que podem gerar esporófitos completamente homozigotos.

Além disso, Hou & Hill (2004) descreveram a formação e anatomia da raiz de esporófitos jovens de *C. richardii* e, embora não mencionado no estudo, nota-se a formação de aerênquima nestes órgãos, e as lacunas parecem se formar por esquizogenia. Em outro trabalho sobre o desenvolvimento de raízes laterais na espécie, também não é mencionada a formação de aerênquima, porém, é ilustrada a presença do tecido em suas imagens (Hou *et al.* 2004).

Tendo em vista todos estes aspectos, é interessante relacionar a formação de aerênquima frente a situações de estresse, principalmente em uma planta modelo para

pteridófitas, e investigar sob o aspecto da limitação hídrica. Com base no hábito anfíbio de *C. richardii*, sugere-se que o estresse possa refletir em uma resposta adaptativa, como por exemplo, um padrão morfológico e citológico diferenciado na formação do aerênquima, alteração morfológica das células formadoras do mesmo e até mesmo alterações na área das lacunas de ar, como um aumento crescente em relação à redução da disponibilidade hídrica; uma vez que lacunas maiores reduziriam o número de células metabolicamente ativas e, conseqüentemente, o gasto energético da planta. As características descritas acima conotariam plasticidade fenotípica à espécie.

Assim, tal projeto é focado na limitação hídrica para observação das respostas adaptativas e da plasticidade fenotípica desta espécie. Isso poderá contribuir para uma melhor compreensão dos processos de desenvolvimento em plantas. Neste caso focamos o aerênquima, cujo tecido tem sido alvo de estudos no âmbito estrutural, fisiológico e adaptativo em diversas famílias de diferentes táxons.

## **2. Objetivos**

### 2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo descrever o desenvolvimento do aerênquima em raízes de *Ceratopteris richardii* e analisá-las sob estresse hídrico.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar possíveis alterações morfológicas e citológicas nos tecidos da raiz durante a formação das lacunas de ar em consequência do estresse hídrico (limitação hídrica);
- Verificar plasticidade fenotípica e a tolerância para a espécie de estudo sob condições de limitação hídrica.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material Botânico

Foi realizado um teste piloto entre os meses de março e julho de 2014, no mês de agosto do mesmo ano foi iniciado o experimento. Tanto no teste piloto, quanto no experimento foram cultivados exemplares da espécie *Ceratopteris richardii*, obtidos a partir de esporos, anteriormente armazenados em nosso laboratório. Os esporos foram higienizados com solução de hipoclorito de sódio 1%, para evitar o crescimento de fungos, e cultivados em meio de cultura agar, em placas de Petri (Fig. 4A), conforme descrito no “Manual Web C-Fern” ([www.c-fern.org](http://www.c-fern.org)), até que as plântulas desenvolvessem de três a quatro folhas. Após foram transferidas para recipientes de cultivo (copos plásticos) (Fig. 4B) com aproximadamente 80g de substrato fertilizado específico para samambaias (“Só Samambaias” – VERDÃO – Lote: 7896762200580 – Responsável técnico: CREA 45448 – RS), onde foram regadas com água destilada, durante um mês, até que se estabelecessem. Posteriormente as amostras foram submetidas ao tratamento com PEG 6000 (polietilenoglicol) em diferentes concentrações, além do controle (sem restrição hídrica). A escolha do agente osmótico utilizado para simular o estresse deu-se por características atribuídas ao PEG, como por exemplo: não penetrar nas células, não ser degradado e não causar toxidez, devido ao seu alto peso molecular (Hasegawa *et al.* 1984; Hardegree & Emmerich 1994). De acordo com Pelegrini *et al.* (2013), estes atributos fazem com que a utilização do PEG para simular efeitos do restrição hídrica em plantas, em trabalhos de pesquisa, tenha sucesso. Para cada concentração já existe um valor, previamente calculado, do potencial hídrico utilizado como padrão (Prof. Claudimar Fior, comunicação pessoal). As concentrações, bem como os valores do potencial hídrico, estão detalhadas na tabela 1.

O tratamento foi realizado através de regas sobre o substrato, bem como no suporte onde se localizavam, individualmente, os recipientes de cultivo. A frequência das regas foi de

três vezes por semana (segundas, quartas e sextas) e o volume de cada solução foi de aproximadamente 50mL sobre o substrato e 20mL em cada suporte, totalizando 70mL de solução por rega. As plantas foram mantidas em equipamento de ambiente controlado (B.O.D), a uma temperatura de aproximadamente 28,5°C, cerca de 60% U.R. e fotoperíodo de 12 horas, desde o início do cultivo dos esporos. No total, vinte amostras foram submetidas ao experimento, sendo quatro para cada tratamento.

O registro fotográfico dos espécimes foi realizado com câmera fotográfica digital Nikon Coolpix P520, com lente NIKKOR 180mm 1:3-5.9.

O material botânico testemunho desses exemplares foi depositado no herbário ICN da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob os números de voucher 177363 (indivíduo fértil) e 177364 (indivíduo vegetativo).

### 3.2. Microscopia fotônica

Após as plantas submetidas ao tratamento emitirem novas raízes, as mesmas foram cortadas em segmentos de aproximadamente 5 mm, desde o ápice até a região madura (sendo coletadas somente as novas raízes e mantendo-se o esporófito em cultivo). Segmentos de pecíolo também foram coletados. O material segmentado foi fixado em glutaraldeído 1% e formaldeído 4%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (McDowell & Trump 1976), mantido por 48 horas no vácuo. A seguir, as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Gabriel 1982) com 3 trocas de 20 minutos cada. A partir desta etapa, o material foi desidratado e incluído em duas resinas diferentes: hidroxietilmetacrilato, raízes e pecíolo; LRWhite (Londres Resin Company), apenas raízes.

Para a inclusão em hidroxietilmetacrilato, o material foi desidratado em série etílica: 10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100% – 20 minutos cada (Freshour *et al.* 1996, mod.) e posteriormente incluído em resina: etapa A – solução 1:1 resina hidroxietilmetacrilato e etanol

100% (4 horas); etapa B – resina hidroxietilmetacrilato pura (6 horas), inserido em formas para polimerização (Gerrits & Smid 1983).

Para inclusão em LRWhite, os segmentos foram primeiramente inseridos em gel de AGAROSE – 3% solução aquosa, este passo foi adicionado devido ao tamanho muito pequeno do material e dificuldade na orientação do mesmo. Subsequentemente, o material foi desidratado em série etílica: 20%, 30%, 50%, 70%, 90% (2 trocas) e 100% (2 trocas) – 30 minutos cada, incluído em resina: etapa A – solução 1:1 resina LRWhite e etanol 100% (8 – 12 horas); etapa B – resina LRWhite pura (8 – 12 horas, 3 trocas), inserido em cápsulas de gelatina e levado a estufa, a 50°C, por 48 horas, para polimerização (Freshour *et al.* 1996, mod.).

Após o material estar totalmente polimerizado, o mesmo foi seccionado a 2 µm de espessura, em Micrótomo Leica RM2265. Os cortes foram depositados sobre lâminas histológicas e secos em placa aquecedora a 50°C.

Para visualização em microscopia fotônica, as secções da região madura foram coradas com Azul de Toluidina (C.I. 52040) 0,1% pH 8,0 (Feder & O'Brien 1968). Já as secções das zonas meristemáticas foram coradas com Azul de Toluidina 0,1% pH 8,0/Tetraborato de sódio 1% aquoso + Fucsina básica 1% em etanol 50% (Abrew *et al.* 1993, mod.). Todos os cortes foram analisados em microscópio óptico Leica DMR-HC, em campo claro. A captura de imagens foi feita utilizando o mesmo microscópio citado acima, com câmera digital acoplada Leica DFC 500, através do programa de captura de imagens Axio Vision SE64.

### 3.3 Análise estatística

As vinte amostras do experimento, sendo sempre a terceira raiz emitida após o início do tratamento, tiveram as circunferências das lacunas de ar, dos segmentos da zona madura da raiz ( $\approx 5$  mm de distância do ápice) medidas, a fim de obtermos dados para comparação das áreas totais do aerênquima entre os tratamentos. As medições foram realizadas utilizando-se o mesmo programa utilizado para a captura de imagens. A soma das áreas das seis lacunas de cada secção transversal foi utilizada para a análise estatística. Para isso, os valores foram inseridos no programa SAS 9.4. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

## 4. Resultados

### 4.1 O esporófito

Quando submetidos ao tratamento (1º dia), todos os esporófitos de *Ceratopteris richardii* tinham o mesmo tamanho, aproximadamente 1,5cm (parte aérea). Nos dias subsequentes, as raízes foram coletadas e as amostras fotografadas e medidas novamente (Tab. 2, Fig. 5A, 5C, 5E, 5G, 5I). O intervalo em que essas etapas ocorreram variou de acordo com as alterações que eram percebidas nas amostras, como por exemplo, morte de algum exemplar, perda de turgescência/intumescimento.

As raízes apresentaram um alongamento proporcional ao aumento de concentração dos tratamentos, ou seja, quanto mais alta a concentração de PEG, maior foi o alongamento, em proporção à parte aérea do esporófito (Fig. 5B, 5D, 5F, 5H, 5J). Contudo, as amostras do T1 apresentaram comportamento semelhante às plantas controle, mantendo um crescimento contínuo e uniforme. Já as amostras do T2 demonstraram maior desenvolvimento, tanto da parte aérea, quanto radicular, durante todo o tratamento. Por outro lado, os exemplares pertencentes aos testes T3 e T4 tiveram a parte aérea mais afetada pelo tratamento, pois o crescimento do esporófito foi de baixo a nulo, conforme dados da tabela 2.

### 4.2 Breve descrição do desenvolvimento da raiz e aerênquima

A raiz desenvolve-se a partir da célula apical (CA) tetraédrica (Fig. 6), que se divide formando um merófito em cada uma de suas faces superiores, sendo que a face inferior origina as células iniciais da coifa. Cada merófito formado pelas três faces superiores da CA se subdivide anticlinalmente, dando origem a seis colunas de células em diferenciação.

As análises dos cortes histológicos de *C. richardii* mostram que suas raízes apresentam formação de aerênquima, que se forma inicialmente por espaços intercelulares

originados por esquizogenia, ou seja, separação celular. Esta formação é seguida de divisões e expansão das células que circundam as lacunas. Esses mecanismos fazem com que as lacunas de ar aumentem de tamanho, revelando um tipo esquizo-expansígeno (Fig. 7). As análises dos cortes maduros das raízes, apresentam uma arquitetura final de aerênquima do tipo favo-de-mel (Fig. 8).

O início da formação das lacunas de ar dá-se no córtex da zona meristemática, ou seja, onde as células ainda não se diferenciaram, a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  da célula apical (CA). Nesta zona, é possível identificar, além do promeristema, representado aqui por uma única célula piramidal, os meristemas primários: protoderme, meristema fundamental e procâmbio (Fig. 6). As células da região meristemática são relativamente pequenas, com núcleo grande, citoplasma denso e parede celular primária delgada. Esta região é revestida pela coifa, que apresenta células maiores do que as da zona meristemática e diferentes entre si; permeando estas células, nota-se a presença de uma substância mucilaginosa, que se mantém apenas na coifa.

#### 4.3 Formação do aerênquima durante a limitação hídrica

Durante os primeiros estádios da formação do tecido aerífero, cada lacuna de ar é circundada por, em média, seis células do córtex. Conforme a diferenciação celular segue, este número vai aumentando, chegando até doze células circundantes nas regiões subsequentes (Fig. 7I). Este padrão manteve-se em todas as amostras do experimento. O padrão de formação das lacunas de ar, semelhante em todas as amostras analisadas, revela que não houve diferença, durante os estádios iniciais da formação do aerênquima, entre os tratamentos (Fig. 9), pois cada lacuna de ar apresenta um número semelhante de células circundantes, quando comparadas as amostras. As análises das secções longitudinais da região

apical das raízes também não demonstraram variações no aspecto das lacunas, bem como nos demais tecidos (Fig. 10). Entretanto, a arquitetura tipo favo-de-mel da região madura mostra diferenças entre os tratamentos. Nota-se que o tamanho das lacunas de ar aumenta de acordo com o aumento de concentração de PEG nas regas disponibilizadas (Fig. 8). Foram analisadas também secções transversais do pecíolo, porém, foram observadas somente amostras dos extremos do tratamento, ou seja, plantas controle e T4. Estas não demonstraram diferenças significativas entre si. As secções transversais de ambos apresentam células de tamanho variável constituindo um o tecido aerífero com grandes espaços de ar, dois feixes vasculares e uma camada de células compondo a epiderme (Fig. 11).

A soma das medidas, ou seja, a área total do aerênquima de cada secção transversal da região madura das raízes mostrou diferentes valores, que parecem aumentar conforme o aumento da concentração de PEG (Figs. 8, 12, Tab. 3). Porém, a análise estatística revelou que a diferença entre as vinte amostras não é significativa para a variável avaliada. Os dados apresentaram alta variabilidade entre algumas amostras submetidas ao mesmo tratamento, o que pode ser evidenciado pelo coeficiente de variação extremamente alto, de 91,96%.

## 5. Discussão

As plantas de todas as amostras do experimento apresentaram formação de aerênquima. Os resultados mostram que, ao analisar qualitativamente as plantas submetidas às diferentes condições hídricas, podem ser encontradas alterações no tamanho das lacunas de ar de suas raízes maduras. Porém, as análises estatísticas evidenciaram que tais alterações não foram significativas para o número amostral. A formação semelhante em todos os exemplares demonstra que o estresse ao qual as plantas foram submetidas parece não ter alterado a formação das lacunas de ar nem o desenvolvimento dos demais tecidos se comparados ao controle.

*Acrostichum*, grupo irmão de *Ceratopteris*, também apresenta formação de aerênquima em suas raízes e pecíolo (Soniya & Krishnakumar 2014), tal formação parece não envolver morte celular para caracterizar este aerênquima de lisígeno, embora não mencionado no trabalho. De acordo com os autores supracitados e Schuettpelz (2007), as espécies do gênero *Acrostichum* são resistentes à salinidade. Tais informações podem revelar duas características compartilhadas pelos dois gêneros: a formação de aerênquima por um mecanismo onde não há morte celular e a resistência a uma concentração osmótica mais elevada, uma vez que os esporófitos de *C. richardii* submetidos às diferentes concentrações de PEG conseguiram aclimatar-se à situação proposta, tolerando a restrição hídrica.

O padrão de seis lacunas de ar, observado nos cortes transversais das raízes de *C. richardii* está relacionando com número de merófitos originados pela célula inicial que é tetraédrica. Esse tipo de desenvolvimento pode ser observado também no trabalho de Hou & Hill (2004). Os autores descreveram o desenvolvimento da raiz do quinto nó de esporófitos jovens de *C. richardii*, observando um padrão de divisão celular cíclico e assimétrico, em sentido horário, ao redor da CA (célula apical), que também conta com seis lacunas de ar originadas pelos merófitos, corroborando com os resultados de nossas análises.

Quanto ao alongamento radicular, crescente em relação à redução da disponibilidade hídrica e em proporção a parte aérea, é plausível admitir que ocorra desta maneira, uma vez que as raízes se prolongam em busca de água no solo. De acordo com Taiz & Zeiger (2013) quando a água para a parte aérea se torna limitante, a expansão foliar reduz-se antes que a atividade fotossintética seja afetada. Essa redução gera uma baixa no consumo de carbono e energia, fazendo com que aumente a proporção de assimilados a ser alocada nas raízes, sustentando a continuidade do crescimento radicular.

As camadas superiores do solo secam em primeiro lugar, à medida que a restrição hídrica avança; isso faz com que as plantas proliferem suas raízes até camadas mais profundas e mais úmidas do solo (Koike *et al.* 2003). Em plantas sem frutos (como é o caso de *C. richardii*), o prolongamento radicular é mais pronunciado do que em plantas com frutos, já que durante o déficit hídrico, os fotossintatos são frequentemente direcionados para os frutos. A competição por fotossintatos entre raízes e frutos resulta em uma maior sensibilidade ao déficit hídrico por parte das plantas durante a reprodução (Taiz & Zeiger 2013), isso pode explicar o fato do alongamento contínuo em *C. richardii*, uma vez que grande parte dos assimilados podem ser direcionados para as raízes, sem que haja competição.

Quanto aos resultados obtidos nas análises do pecíolo, é possível afirmar que o órgão não sofreu alterações em sua anatomia, pois as secções transversais tanto do controle, quanto do T4 apresentaram uma distribuição de células e tecido aerífero semelhantes. Contudo, a morfologia externa mostrou-se mais sensível, visto que o crescimento do órgão mostrou-se menor no T4.

A maioria das plantas aquáticas formam aerênquima em suas raízes, caules e folhas (Rascio 2002). De acordo com o mesmo autor, esta característica está associada à evolução convergente destes organismos para sobreviverem em ambiente aquático. Já outras plantas,

como anfíbias e/ou não aquáticas, podem formar aerênquima em resposta a baixa aeração independente de estarem submersas ou não. Portanto, os limites de adaptação entre estes tipos de plantas, com base na presença de aerênquima não são claros (Justin & Armstrong 1987; Jackson & Armstrong 1999; Jung *et al.* 2008).

A adaptabilidade para modificar algumas características estruturais, como a variação no tamanho das lacunas, encontrada em *C. richardii* aliada à resistência em condições de estresse, pode estar associada ao hábito anfíbio, o que pode favorecer seu estabelecimento em diferentes ambientes. Posto que espécies anfíbias podem apresentar ajustes estruturais e fisiológicos, devido a passagem da forma terrestre para aquática e vice-versa (Leite *et al.* 2012), é razoável pensar nessa associação.

Este trabalho buscou analisar a formação de aerênquima nas raízes da samambaia aquática *Ceratopteris richardii*, frente a uma situação de estresse. Os resultados descritos acima revelam importantes características para a espécie de estudo, que parece aclimatar-se a situação de limitação hídrica à qual foi submetida, visto que, os diferentes tratamentos não afetaram a o processo de formação do aerênquima e mantiveram o mesmo desenvolvimento em relação ao controle.

Quanto às características morfológicas de *C. richardii*, podemos inferir que a espécie possui plasticidade fenotípica, pois o alongamento radicular e redução da parte aérea parecem apoiar essa hipótese. Entretanto, um maior número de plantas deve ser analisado.

Unindo os atributos mencionados, pode-se inferir que *C. richardii* possui características que podem torná-la mais competitiva para sobrevivência em ambientes sujeitos à restrição hídrica.

Estes dados contribuem para um melhor entendimento sobre o desenvolvimento e os mecanismos de resistência das plantas de hábito anfíbio. Contudo, estudos mais aprofundados

relacionados a este ou outros tipos de estresse, tais como os nutricionais, por exemplo, envolvendo um número maior de exemplares, poderiam ajudar a elucidar questões relacionadas a formação de aerênquima e o ambiente.

## Referências bibliográficas

- Abrew MA, Barosa LGV, Rossi MA. 1993. Toluidine Blue-Basic Fuchsin Stain for Glycolmethacrylate Embedded Tissue. *Journal of Histotechnology* 16: 139–140.
- Banks JA, Hickok L, Webb, MA. 1993. The programming of sexual phenotype in the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *International Journal of Plant Sciences* 154: 522–534.
- Banks JA. 1999. Gametophyte development in ferns. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50(1): 163–186.
- Bellini C, Pacurar DI, Perrone I. 2014. Adventitious Roots and Lateral Roots: Similarities and Differences. *Annual Review of Plant Biology* 65: 639–666.
- Bierhorst DW. 1971. *Morphology of vascular plants*. New York: Macmillan.
- Bower FO. 1928. *The ferns (Filicales): treated comparatively with a view to their natural classification*. New Delhi: Today, Tomorrow's Book Agency.
- Bradshaw AD. 1965. Advances in genetics. In: Caspary EM, Thoday JM. *Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants*. New York: Academic Press.
- Burdick DM. 1989. Root aerenchyma development in *Spartina patens* in relation to flooding. *American Journal of Botany* 76: 777–780.
- Campbell DH. 1905. *The structure and development of mosses and ferns*. New York: The Macmillan.
- Cardoso GL, Lomônaco C. 2003. Variações fenotípicas e potencial plástico de *Eugenia calycina* Cambess. (Myrtaceae) em uma área de transição cerrado-vereda. *Revista Brasileira de Botânica* 26(1): 131–140.
- Chatterjee A, Roux SJ. 2000. *Ceratopteris richardii*: a productive model for revealing secrets of signaling and development. *Journal of Plant Growth Regulation* 19(3): 284–289.
- Chaves Filho JT, Stacciarini-Seraphin E. 2001. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.Hil.) em resposta ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Botânica* 24(2): 199–204.

- Dantas BF, Aragão CA, Alves JD. 2001. Cálcio e o desenvolvimento de aerênquimas e atividade de celulase em plântulas de milho submetidas a hipóxia. *Scientia Agricola* 58(2): 251–257.
- De Bary A. 1877. Comparative anatomy of the vegetative organs of the phanerogams and ferns. (Translation by Bower, FO, Scott, DH. 1884). Oxford: Clarendon Press.
- Drew MC, Jackson MB, Giffard S. 1979. Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. *Planta* 147(1): 83–88.
- Drew MC, He CJ, Morgan PW. 1989. Decreased ethylene biosynthesis, and induction of aerenchyma, by nitrogen or phosphate-starvation in adventitious roots of *Zea mays* L. *Plant Physiology* 91: 266–271.
- Evans DE. 2004. Aerenchyma formation. *New Phytologist* 161(1): 35–49.
- Feder N, O'Brien TP. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55: 123–142.
- Freshour G, Clay RP, Fuller MS, Albersheim, P, Darvill, AG, Hahn MG. 1996. Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiology* 110(4): 1413–1429.
- Gabriel BL. 1982. Biological electron microscopy. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Gastony GJ, Johnson WP. 2001. Phylogenetic placements of *Loxoscaphe thecifera* (Aspleniaceae) and *Actiniopteris radiata* (Pteridaceae) based on analysis of rbcL nucleotide sequences. *American Fern Journal* 91(4): 197–213.
- Gerrits PO, Smid L. 1983. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* 132(1): 81–85.
- Gifford EM. 1983. Concept of apical cells in bryophytes and pteridophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 34: 419–440.

- Gifford EM, Foster AS. 1989. Morphology and evolution of vascular plants. New York: Freeman.
- Gunawardena AHLAN, Pearce DME, Jackson, MB, Hawes, CR, Evans DE. 2001. Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L.) promoted by ethylene. *Plant, Cell and Environment* 24: 1369–1375.
- Gunning BES. 1982. The root of the water fern *Azolla*: Cellular basis of development and multiple roles for cortical microtubules. In: Subtelny A, Green PB, editors. *Developmental order: its origin and regulation*. New York.
- Gunning BES, Hughes JE, Hardham AR. 1978. Formative and proliferative cell divisions, cell differentiation, and developmental changes in the meristem of *Azolla* roots. *Planta* 143:121–144.
- Haberlandt G. 1896. *Physiological plant anatomy*. (Translation by Drummond, M. 1914). London: Macmillan.
- Hardegree SP, Emmerich WE. 1994. Seed germination response to polyethylene glycol solution depth. *Seed Science and Technology* 22(1): 1–7.
- Hasebe M, Wolf PG, Pryer KM, Ueda K, Ito M, Sano R, Gastony GJ, Yokoyama J, Manhart JR, Murakami N, Crane EH, Haufler CH, Hauk WD. 1995. Fern phylogeny based on rbcL nucleotide sequences. *American Fern Journal* 85: 134–181.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Handa S, Handa AK. 1984. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *HortScience* 19(3): 371–377.
- He CJ, Drew MC, Morgan PW. 1994. Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* L. during hypoxia or nitrogen-starvation. *Plant Physiology* 105(3): 861–865.
- He CJ, Finlayson SA, Drew MC, Jordan WR, Morgan PW. 1996. Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of *Zea mays* L. subjected to mechanical impedance and hypoxia. *Plant Physiology* 112(4): 1679–1685.
- Hickok LG, Warne TR, Fribourg RS. 1995. The biology of the fern *Ceratopteris* and its use as a model system. *International Journal of Plant Sciences* 156: 332–345.

- Hoffman JC, Vaughn KC. 1995. Using the developing spermatogenous cells of *Ceratopteris* to unlock the mysteries of the plant cytoskeleton. *International Journal of Plant Sciences* 156(3): 346–358.
- Hou GC, Hill JP. 2004. Developmental anatomy of the fifth shoot-borne root in young sporophytes of *Ceratopteris richardii*. *Planta* 219: 212–220.
- Hou GC, Hill JP, Blancaflor EB. 2004. Developmental anatomy and auxin response of lateral root formation in *Ceratopteris richardii*. *Journal of Experimental Botany* 55(397): 685–693.
- Imaichi R. 2008. Meristem organization and organ diversity in *Biology and Evolution of Ferns*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jackson MB, Armstrong W. 1999. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biology* 1(3): 274–287.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. Porto Alegre: Artmed.
- Jung J, Lee SC, Choi HK. 2008. Anatomical patterns of aerenchyma in aquatic and wetland plants. *Journal of Plant Biology* 51(6): 428–439.
- Justin SHF, Armstrong W. 1987. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. *New Phytologist* 106: 465–495.
- Kawase M. 1972. Effect of flooding on ethylene concentration in horticultural plants. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 97: 584–588.
- Kawase M. 1974. Role of ethylene in induction of flooding in sunflower. *Physiologia Plantarum* 31: 29–38.
- Kenrick P, Crane PR. 1997. The Origin and Evolution of Plants on Land. *Nature* 389: 33–39.
- Koike T, Kitao M, Quoreshi AM, Matsuura Y. 2003. Growth characteristics of root-shoot relations of three birch seedlings raised under different water regimes. *Plant Soil* 255: 303–310.
- Kramer KU. 1990. Vittariaceae. In: Kramer KU, Green PS. *The Families and Genera of Vascular Plants. Pteridophytes and Gymnosperms*. Berlin: Springer-Verlag.

- Leite KRB, França F, Scatena VL. 2012. Structural variations among monocot emergent and amphibious species from lakes of the semi-arid region of Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 72(1): 163–169.
- Leroux O, Eeckhout S, Viane RLL, Popper ZA. 2013. *Ceratopteris richardii* (C-Fern): a model for investigating adaptive modification of vascular plant cell walls. *Frontiers in Plant Science* 23(4): 367.
- Lloyd RM. 1974. Systematics of the genus *Ceratopteris* Brongn. (Parkeriaceae) II. Taxonomy. *Brittonia* 26(2): 139–160.
- Ludlow MM, Muchow RC. 1990. A critical evolution of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Advances in Agronomy* 43: 107–153.
- Marschner H. 1986. Mineral nutrition in higher plants. London: Academic Press.
- Mascarenhas HAA, Miranda MAC, Tanaka RT. 1992. Colapso do pecíolo em folhas de soja. *Pesquisa agropecuária Brasileira* 27(2): 343–348.
- Masuyama S. 1992. Clinal variation of frond morphology and its adaptive implication in the fern *Ceratopteris thalictroides* in Japan. *Plant Species Biology* 7(2-3): 87–96.
- McCree KJ, Fernández CJ. 1989. Simulation model for studying physiological water stress responses of whole plants. *Crop Science* 29: 353–360.
- McDowell EM, Trump BF. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100(8): 405–414.
- Ogura Y. 1972. Comparative anatomy of vegetative organs of the pteridophytes. Berlin: Gebrüder Borntraeger.
- Pelegri LL, Borcioni E, Nogueira AC, Koehler HS, Quoirin MGG. 2013. Efeito do estresse hídrico simulado com NaCl, Manitol e PEG (6000) na germinação de sementes de *Erythrina falcata* Benth. *Ciência Florestal* 23(2): 511–519.
- Pires ND, Dolan L. 2012. Morphological evolution in land plants: new designs with old genes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367(1588): 508–518.

- Prado J. 1993. Revisão taxonômica de *Pteris* L. (Pteridaceae) no Brasil. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Pryer KM, Smith AR, Skog JE. 1995. Phylogenetic relationships of extant ferns based on evidence from morphology and rbcL sequences. *American Fern Journal* 85(4): 205–282.
- Rascio N. 2002. The underwater life of secondarily aquatic plants: some problems and solutions. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(4): 401–427.
- Raven JA, Edwards D. 2001. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *Journal of Experimental Botany* 52: 381–401.
- Santos RF, Carlesso R. 1998. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 2(3): 287–294.
- Scheiner SM. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 35–68.
- Schenck H. 1890. Ueber das Aërenchym, ein dem Kork homologes Gewebe bei Sumpfpflanzen. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik* 20: 526–574.
- Schneider H. 1996. *Vergleichende Wurzelanatomie der Farne*. Aachen: Shaker Press.
- Schneider H, Schuettpelz E, Pryer KM, Cranfill R, Magallón S, Lupia R. 2004. Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature* 428(6982): 553–557.
- Schuettpelz E, Schneider H, Huiet L, Windham MD, Pryer KM. 2007. A molecular phylogeny of the fern family Pteridaceae: Assessing overall relationships and the affinities of previously unsampled taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 1172–1185.
- Seago JL, Fernando DD. 2013. Anatomical aspects of angiosperm root evolution. *Annals of Botany* 112(2): 223–238.
- Seago JL, Marsh LC, Stevens KJ, Soukup A, Votrubová O, Enstone DE. 2005. A re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. *Annals of Botany* 96(4): 565–579.
- Smith AR, Pryer KM, Schuettpelz E, Korall P, Schneider H, Wolf PG. 2006. A classification for extant ferns. *Taxon* 55(3): 705–731.

- Soniya ML, Krishnakumar G. 2014. Studies on ecological anatomy of the mangrove fern *Acrostichum aureum* L. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences 4(1): 195–200.
- Taiz L, Zeiger E. 2013. Fisiologia Vegetal. Porto Alegre: Artmed.
- Tryon RM, Tryon AF. 1982. Ferns and allied plants, with special reference to Tropical America. New York: Springer Verlag.
- Tryon RM, Tryon AF, Kramer KU. 1990. Pteridaceae. In: Kramer KU, Green PS. The Families and Genera of Vascular Plants. Pteridophytes and Gymnosperms. Berlin: Springer-Verlag.
- Wells CL, Pigliucci M. 2000. Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 3(1): 1–18.

## **ANEXO 1 – TABELAS**

**Tabela 1.** Disposição amostral. Tratamentos (T), suas respectivas concentrações de Polietileno glicol (PEG 6000) e valores de potencial hídrico (MPa).

<b>Tratamentos</b>	<b>Concentração de PEG 6000 (g/L)</b>	<b>Potencial hídrico (MPa)</b>
<b>T4</b>	92,4g/L	-0,13 MPa
<b>T3</b>	60,0g/L	-0,066 MPa
<b>T2</b>	38,0g/L	-0,033 MPa
<b>T1</b>	23,1g/L	-0,017 MPa
<b>T0</b>	Água destilada	0 MPa

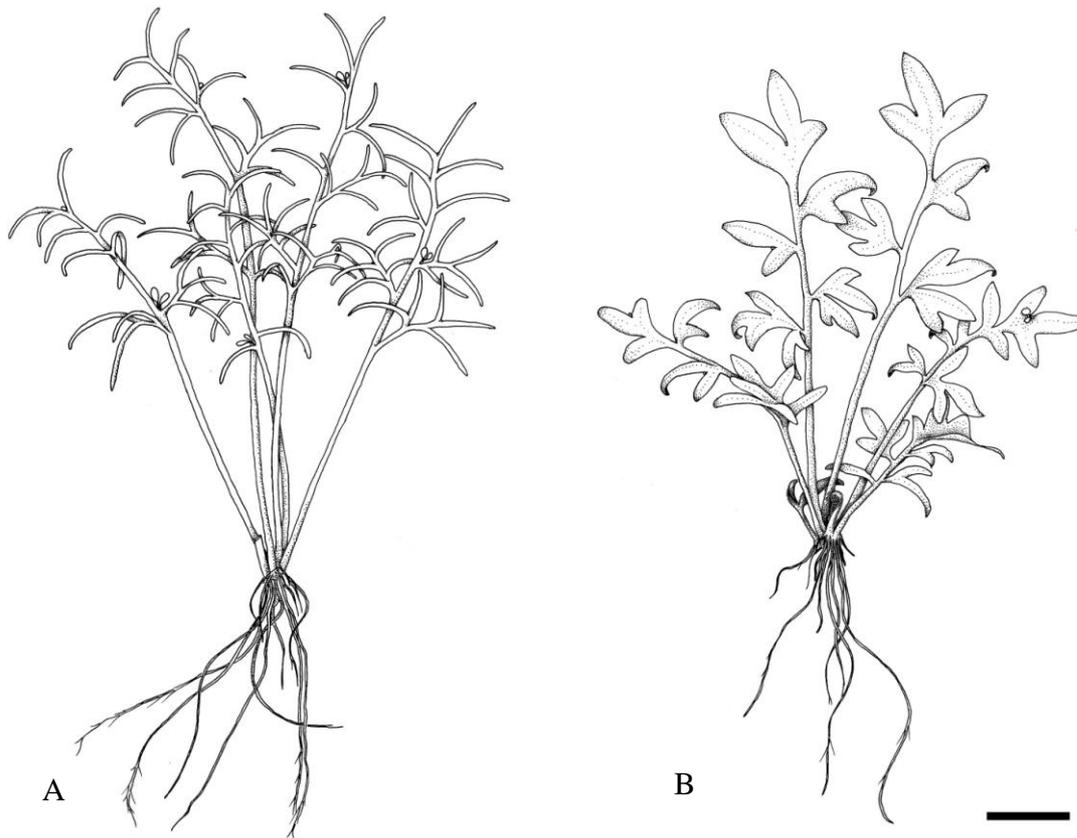
**Tabela 2.** Análise dos esporófitos de *C. richardii*. Crescimento (cm) durante os dias de tratamento.

<b>Tratamentos</b>	<b>1°</b>	<b>15°</b>	<b>30°</b>	<b>50°</b>
<b>T4</b>	≈1,5cm	1,5cm	1,5cm	
<b>T3</b>	≈1,5cm	2,5cm	3cm	3cm
<b>T2</b>	≈1,5cm	4cm	7,5cm	11cm
<b>T1</b>	≈1,5cm	3,5cm	4cm	5cm
<b>T0</b>	≈1,5cm	2,5cm	5cm	9cm

**Tabela 3.** Área das lacunas de ar formadas nas raízes de *C. richardii*. Medições da área total das lacunas em cada tratamento, em corte transversal.

<b>Tratamentos</b>	<b>Área total em <math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>Área total em <math>\text{mm}^2</math></b>
<b>T4</b>	18.178,36 $\mu\text{m}^2$	0,0181 $\text{mm}^2$
<b>T3</b>	11.948,97 $\mu\text{m}^2$	0,0119 $\text{mm}^2$
<b>T2</b>	7.941,73 $\mu\text{m}^2$	0,0079 $\text{mm}^2$
<b>T1</b>	4.765,38 $\mu\text{m}^2$	0,0047 $\text{mm}^2$
<b>T0</b>	8.756,56 $\mu\text{m}^2$	0,0087 $\text{mm}^2$

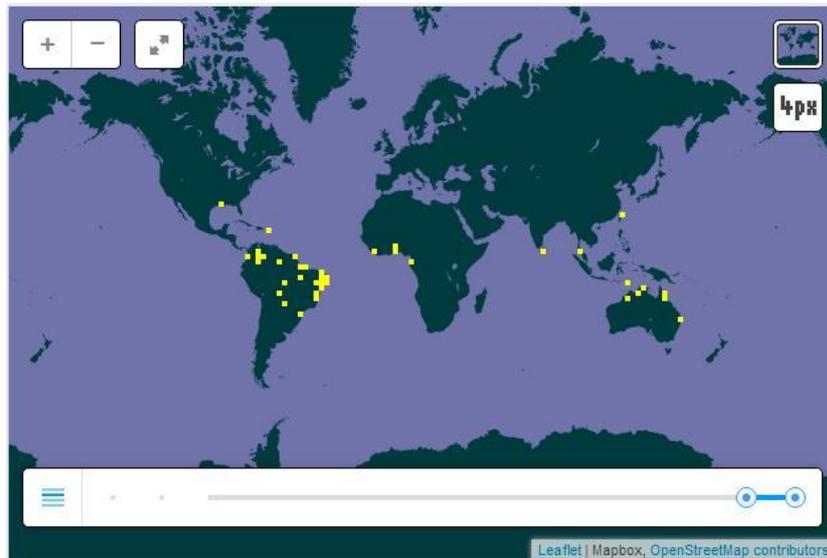
## **ANEXO 2 – FIGURAS**



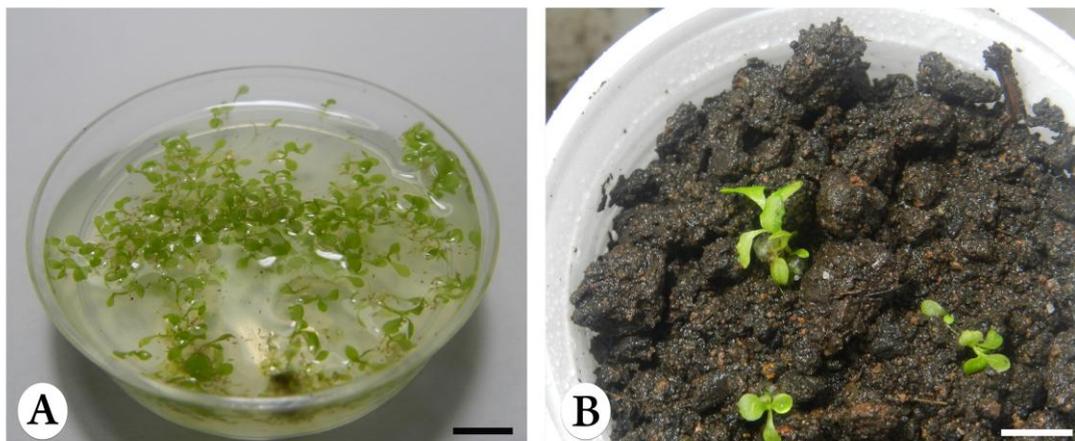
**Figura 1.** Desenho esquemático dos esporófitos jovens de *C. richardii* evidenciando dimorfismo foliar. **A)** indivíduo fértil. **B)** indivíduo estéril. Barra = 2 cm. Desenho de Bianca Mastrantonio.



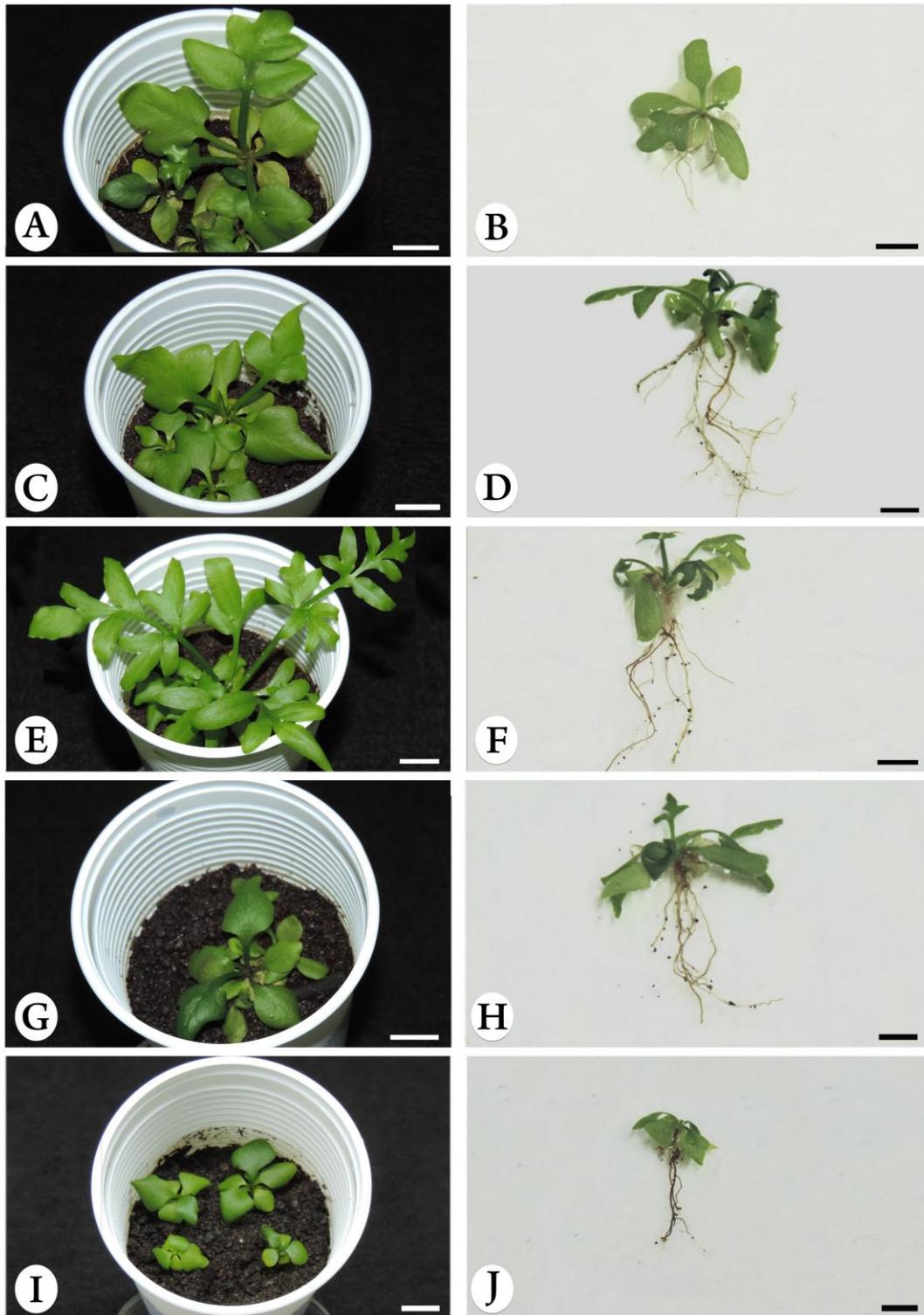
**Figura 2.** Parte da filogenia da família Pteridaceae. Eclipse vermelho evidenciando a subfamília Ceratopteridoideae e eclipse azul evidenciando o gênero *Ceratopteris*. Modificado de Schuettpelz *et al.*, 2007.



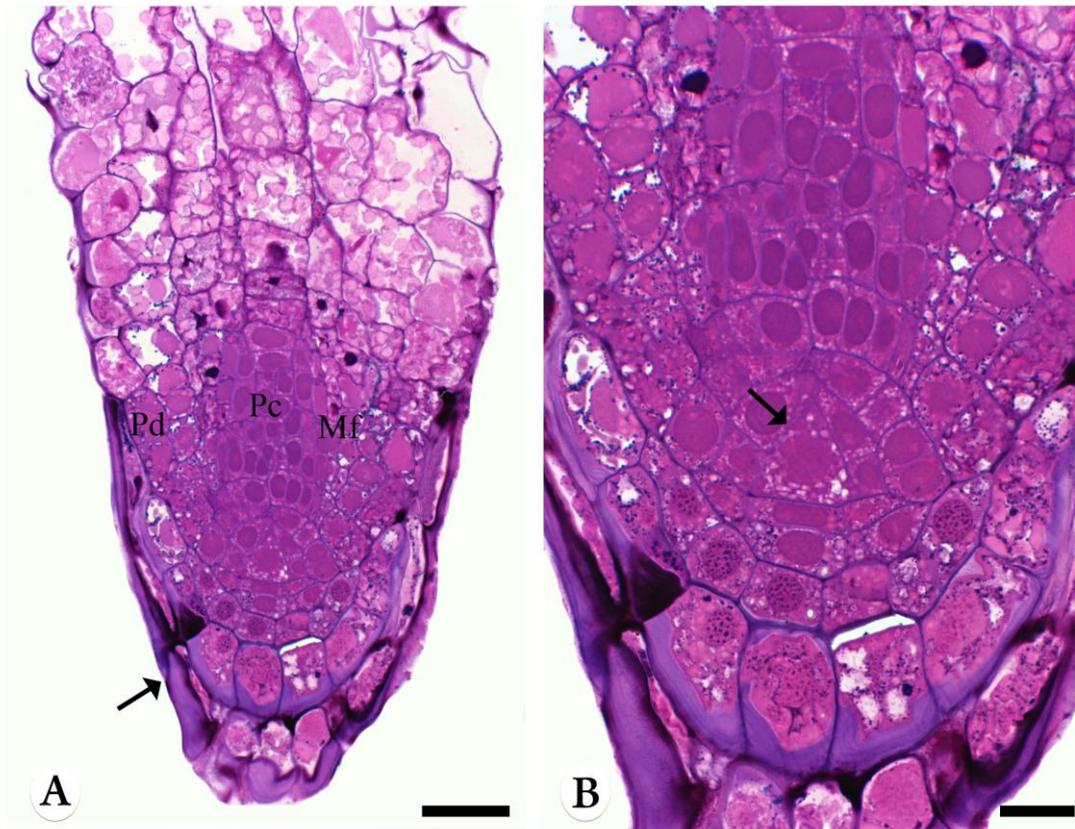
**Figura 3.** Distribuição atual do gênero *Ceratopteris*. Retirado de GBIF Secretariat: GBIF Backbone Taxonomy, 2013-07-01.



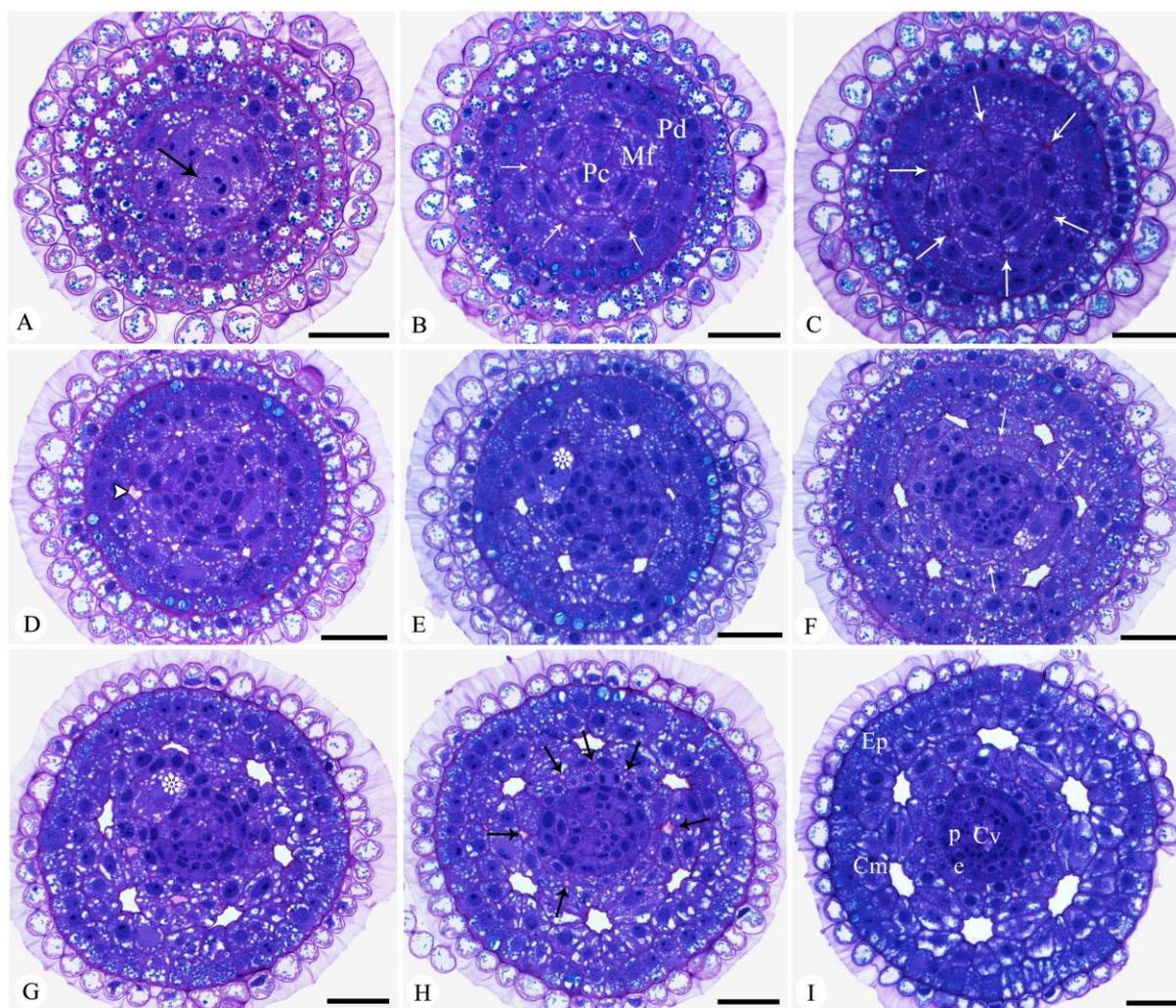
**Figura 4.** A) plântulas de *C. richardii* em meio de cultura. B) plântulas de *C. richardii* no recipiente de cultivo. Barras = 1 cm.



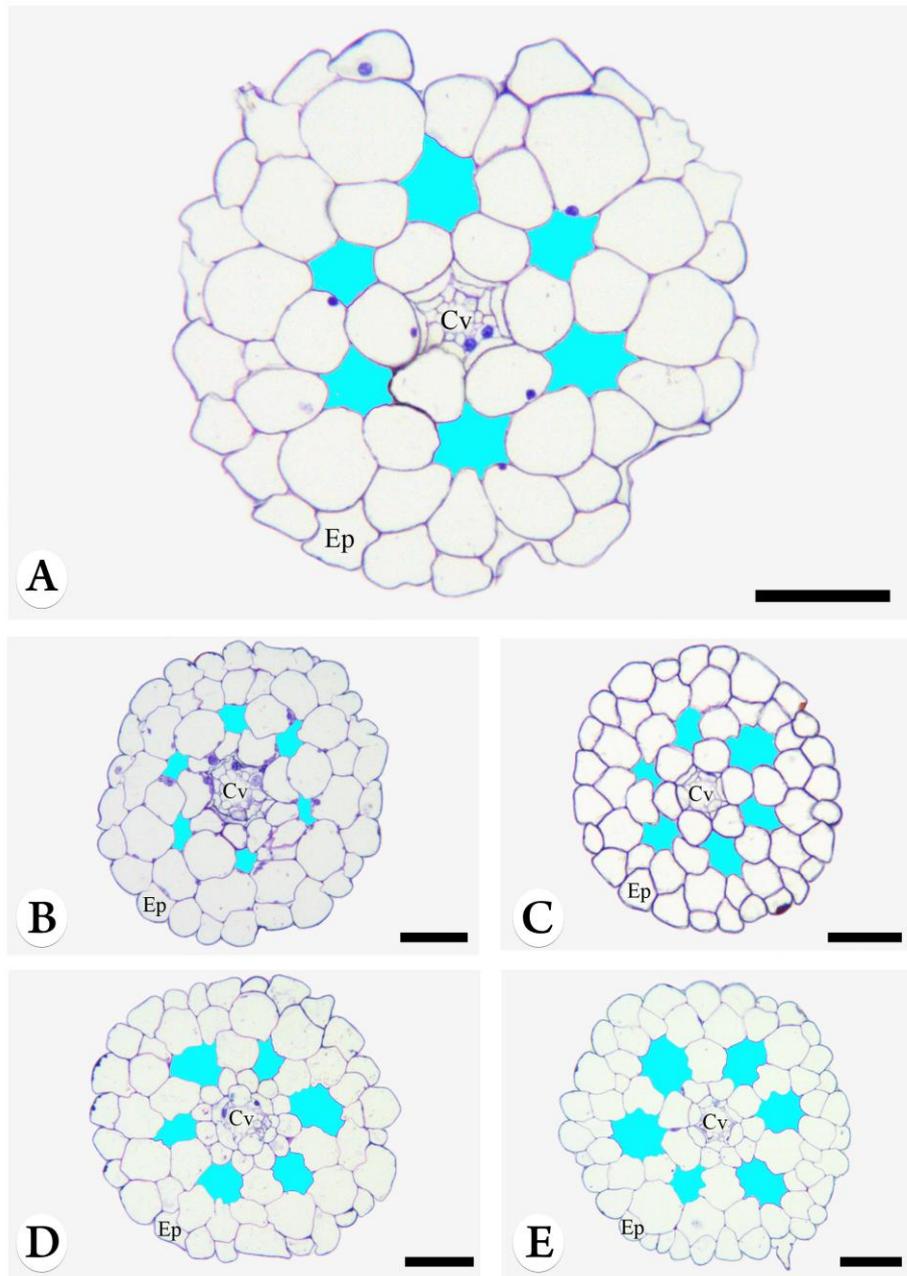
**Figura 5.** Aspecto geral dos esporófitos de *C. richardii* com 30 dias de tratamento **A)** T0. **C)** T1. **E)** T2. **G)** T3. **I)** T4. Alongamento radicular das amostras **B)** T0. **D)** T1. **F)** T2. **H)** T3. **J)** T4. Barras = 1 cm.



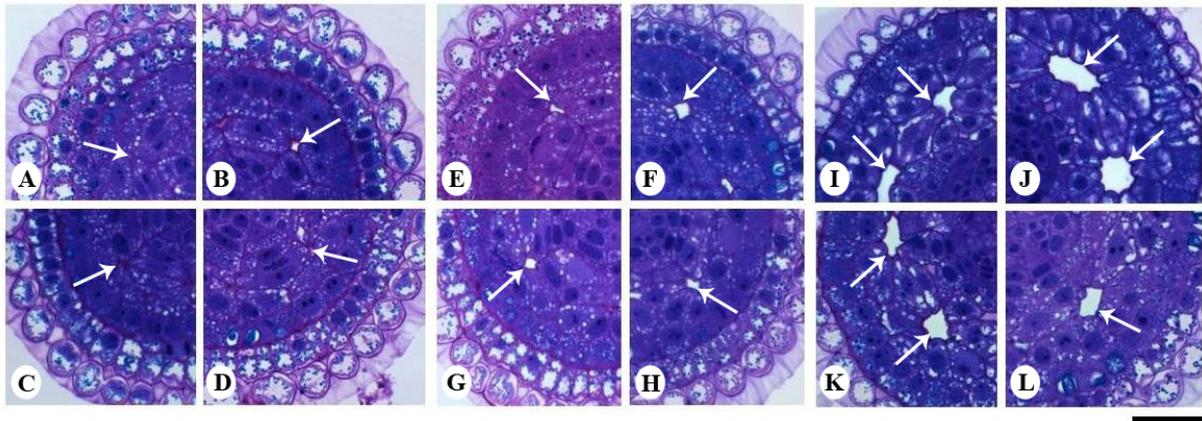
**Figura 6.** Fotomicrografia de secção longitudinal da raiz de *C. richardii*, em resina hidroxietilmetacrilato, corada com azul de Toluidina 0,1% pH 8,0/Tetraborato de sódio 1% aquoso + Fucsina básica 1% em etanol 50%. Evidenciando os três meristemas primários. **A)** Protoderme (Pd); Meristema fundamental (Mf); Procâmbio (Pc). Seta indicando a coifa. Barra = 50  $\mu\text{m}$ . **B)** seta evidenciando a célula apical tetraédrica. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .



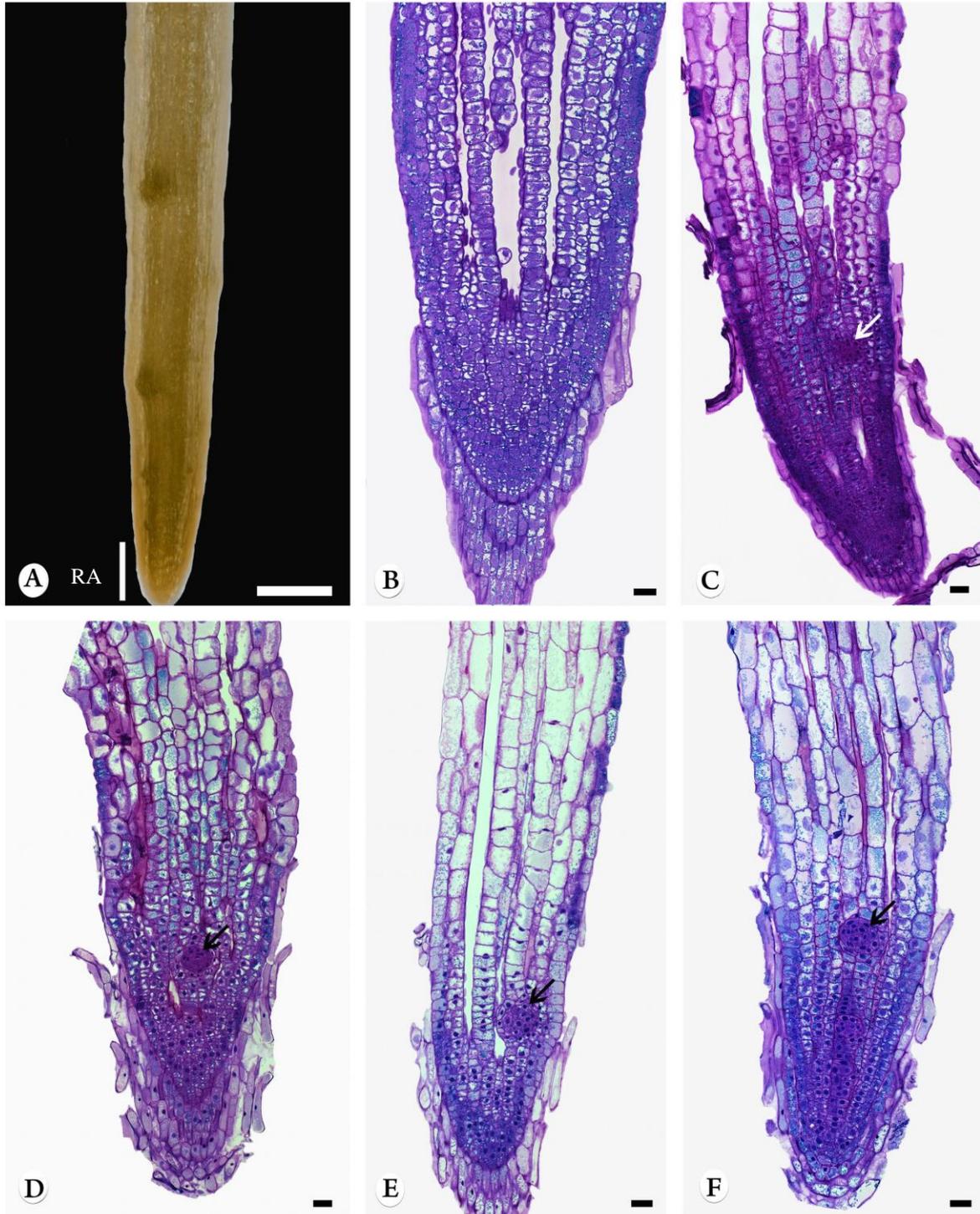
**Figura 7.** Sequência de cortes transversais do ápice radicular de *C. richardii*, em resina hidroxietilmetacrilato, corado com azul de Toluidina 0,1% pH 8,0/Tetraborato de sódio 1% aquoso + Fucsina básica 1% em etanol 50%. **A)** célula apical tetraédrica (seta). **B)** primeiros espaços intercelulares sendo formados (setas). Protoderme (Pd); Meristema fundamental (Mf); Procâmbio (Pc). **C)** região com os seis espaços intercelulares definidos (setas). **D)** início da expansão das células circundantes da lacuna de ar e aumento da lacuna (cabeça de seta). **E)** célula formadora de raiz lateral (asterisco). **F)** início da formação de uma segunda camada de lacunas no córtex (setas). **G)** células circundantes das lacunas de ar em expansão. Célula formadora de raiz lateral em crescimento (asterisco). **H)** aumento no número de espaços intercelulares da segunda camada de lacunas de ar (setas). **I)** córtex com as lacunas de ar bem definidas e células circundantes em expansão. Epiderme (Ep); CórteX médio (Cm); Endoderme (e); Periciclo (p); Cilindro vascular (Cv). Barras = 50 μm.



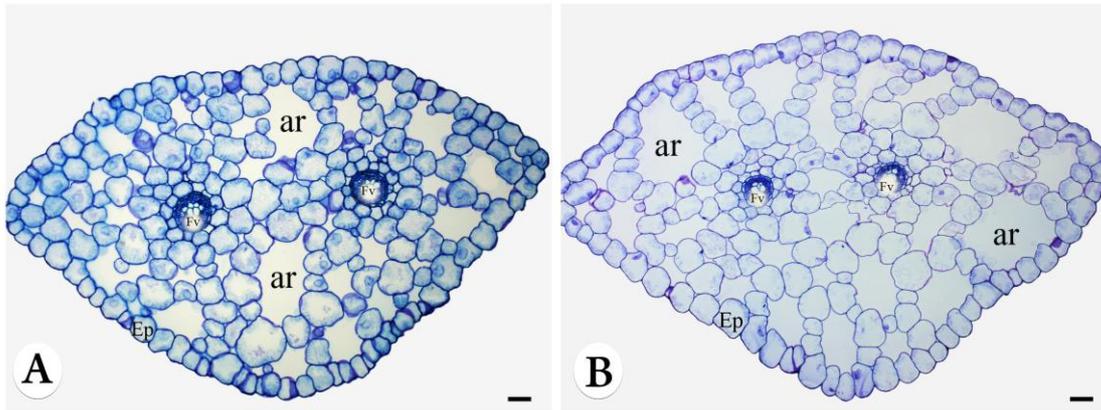
**Figura 8.** Cortes transversais da região madura das raízes de *C. richardii*, em resina LRWhite, corados com azul de Toluidina 0,1%. **A)** T0. **B)** T1. **C)** T2. **D)** T3. **E)** T4. Epiderme (Ep); Cilindro vascular (Cv). Lacunas de ar em ciano. Barra = 50  $\mu$ m.



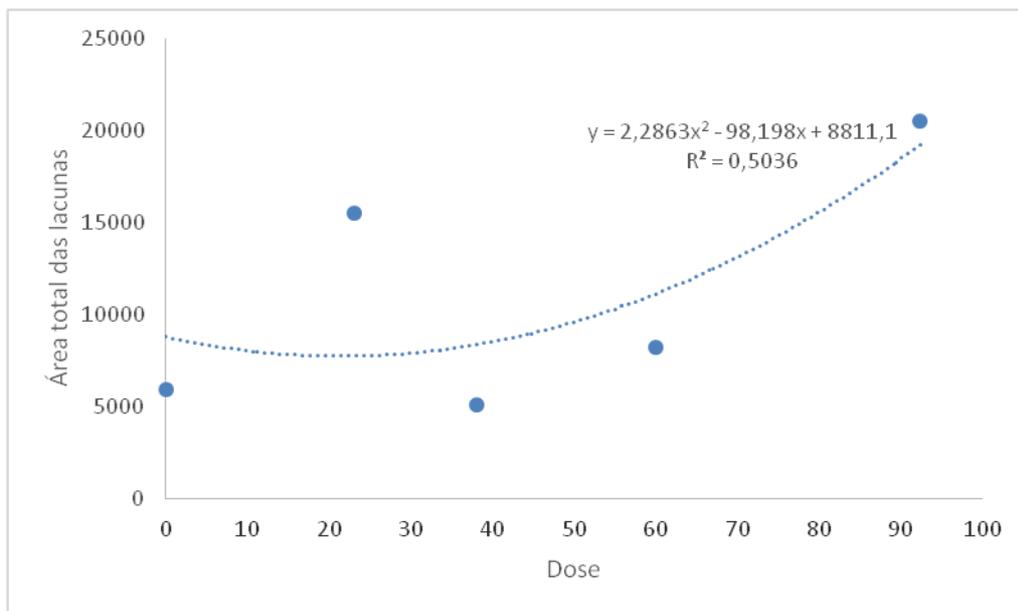
**Figura 9.** Secções transversais dos quatro tratamentos em três diferentes fases. Material incluído em resina hidroxietilmetacrilato, corado com azul de Toluidina 0,1% pH 8,0/Tetraborato de sódio1% aquoso + Fucsina básica 1% em etanol 50%. Fase um. **A)** T1. **B)** T2. **C)** T3. **D)** T4. Fase dois. **E)** T1. **F)** T2. **G)** T3. **H)** T4. Fase três. **I)** T1. **J)** T2. **K)** T3. **L)** T4. Abertura das lacunas (setas). Barra = 50 $\mu$ m.



**Figura 10.** A) Imagem em estereomicroscópio mostrando a região apical da raiz. Região apical (RA). Barra = 2 mm. Cortes longitudinais dos cinco tratamentos, em resina hidróxi-etilmetacrilato, corado com azul de Toluidina 0,1% pH 8,0/Tetraborato de sódio 1% aquoso + Fucsina básica 1% em etanol 50%. B) T0. C) T1. D) T2. E) T3. F) T4 mostrando as lacunas de ar. Formação de raiz lateral (setas). Barras: B até E = 50µm.



**Figura 11.** Secções transversais do pecíolo de *C. richardii*, em resina hidroxietilmetacrilato, corado com azul de Toluidina 0,1%. **A)** T0. **B)** T4. Epiderme (Ep); Feixe vascular (Fv); lacuna de ar (ar). Barra = 50 µm.



**Figura 12.** Área total das lacunas de ar das raízes (µm<sup>2</sup>) por concentração de PEG (g/L).